



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0051729
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 08월 30일
Date of Application
AUG 30, 2002

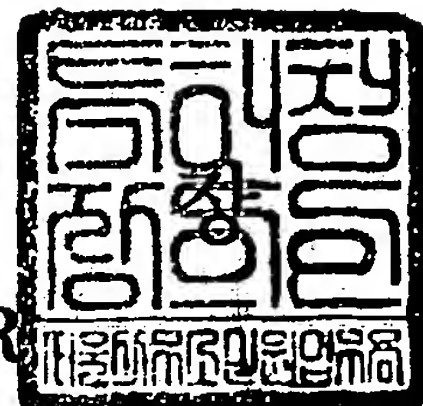
출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s) KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY



2003 04 03 일
년 월

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	2763
【제출일자】	2002.08.30
【국제특허분류】	C07K
【발명의 명칭】	B형 간염 바이러스 폴리머라제와 단백질 p11의 복합체 및 HepG2 세포에서 상기 복합체의 이동 조절 방법
【발명의 영문명칭】	Complex of Hepatitis B Virus Polymerase with p11 and Method for controlling Movement of the Complex in HepG2 Cell
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	주성민
【대리인코드】	9-1998-000517-7
【포괄위임등록번호】	1999-023588-9
【대리인】	
【성명】	장수길
【대리인코드】	9-1998-000482-8
【포괄위임등록번호】	1999-023587-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한예선
【성명의 영문표기】	HAN, Ye Sun
【주민등록번호】	570104-2009414
【우편번호】	156-090
【주소】	서울특별시 동작구 사당동 극동아파트 102-302
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최주현
【성명의 영문표기】	CHOI, Juhyun
【주민등록번호】	711120-1056511

【우편번호】	420-102
【주소】	경기도 부천시 원미구 역곡2동 영우빌라 1호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임대식
【성명의 영문표기】	LIM,Dae-sik
【주민등록번호】	650301-1056318
【우편번호】	132-030
【주소】	서울특별시 도봉구 쌍문동 현대아파트 104동 605호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 주성민 (인) 대리인 장수길 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	19 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	4 항 237,000 원
【합계】	266,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	133,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 B형 간염에 관련된 B형 간염 바이러스 폴리머라제 (HBVPol)에 비공유 결합된 11 kDa의 칼슘 결합 단백질 p11의 복합체에 관한 것이다. HBVPol/p11 복합체는 세포의 핵 안에 존재하는 전골수성 백혈병 핵체 (Promyelocytic Leukemia Nuclear Body, PMLNB)로 이동하며 이 현상은 세포내 칼슘의 영향을 받아 p11이 수행한다. 본 발명은 HBV와 간암 발생 과정을 이해하고 치료의 기초가 될 수 있으며, 칼슘 저해제 스크리닝을 통한 간암치료제 개발에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

B형 간염 바이러스, HBVPol, p11, 간암세포, 칼슘 농도, 복합체

【명세서】

【발명의 명칭】

B형 간염 바이러스 폴리머라제와 단백질 p11의 복합체 및 HepG2 세포에서 상기 복합체의 이동 조절 방법 {Complex of Hepatitis B Virus Polymerase with p11 and Method for controlling Movement of the Complex in HepG2 Cell}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 HBVPol 및 그의 결실 변이체의 서열 모식도.

도 1b는 효모 2 하이브리드 시스템(yeast two hybrid system)을 이용하여 검색한 p11과 결합하는 B형 간염 바이러스 폴리머라제 (HBVPol) 단백질 및 그의 결실 변이체의 부분 검색 사진.

도 2는 HBVPol와 p11의 시험관내 (in vitro) 결합 분석 사진.

도 3은 HepG2 세포 내에서 HBVPol와 p11의 위치를 보여주는 사진.

도 4는 HepG2 세포 내에서 HBVPol를 전골수성 백혈병 핵체 (Promyelocytic Leukemia Nuclear Body, PMLNB)로 유도하는 p11의 기능을 보여주는 사진.

도 5는 Ca^{++} 이온의 농도에 따라 HBVPol/p11 복합체가 세포 내에서 이동함을 보여주는 사진.

도 6은 HBV가 발생하는 2,2,1.5 HepG2 세포에 P11이 존재할 경우 PMLNB의 크기 또는 수가 정상세포의 PMLNB보다 증가한 것을 보여주는 사진.

도 7은 HBVPol 코딩 서열을 포함하는 pCMV-tag2A 플라스미드 모식도.

도 8은 p11 코딩 서열을 포함하는 pCMV-tag3B 플라스미드 모식도.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <10> 본 발명은 B형 간염에 관련된 B형 간염 바이러스 역전사효소 (HBVPol)에 비공유 결합된 11 kDa의 칼슘 결합 단백질 p11의 복합체에 관한 것이다.
- <11> HBV 감염에 의한 간암의 발병이 이미 보고 되어있고 (Zoulim, F., 1999), HBV 감염의 치료를 위한 인터페론이나 뉴클레오시드 유사체(Zoulim, F., 1999)의 사용이 보고되고 있으나, 이것은 감염자 중 일부에 국한된 것이며 HBV를 완전히 제거할 수는 없어 보다 나은 치료 물질이 요구되고 있다.
- <12> 이미 HBVPol과 결합하는 세포내 인자를 찾는 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 오리 B형 간염 바이러스의 Pol가 Hsp90, p23 및 Hsp70과 결합하여 (Hu, J., D. O. Toft, *et al.*, 1997) 바이러스 생장과정에서의 중요한 역할에 대한 가능성을 보여주었다. 이 연구는 사람 감염성이 있는 HBV에서는 확인되지 않았으나, 한 단백질로서 다수의 효소활성을 갖는 HBVPol는 세포 내의 인자와 결합 가능성이 높고 이 과정을 통하여 여러 효소의 활성을 완성할 것으로 사료된다.
- <13> HBVPol는 대장균이나 효모에서 그 발현율이 현저히 낮아 생화학적 연구 및 구조생물학적 연구가 불가능하였다. 이런 이유로 생 바이러스를 사용하거나 시험관내 진행세포 발현 등을 통한 실험이 실시되어 왔으나, 이들의 실험은 수행상의 위험성과 비용적 측면에서 어려움이 존재하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 본 발명의 목적은 HBVPol과 결합할 수 있는 단백질을 찾고 이를 클로닝하여 인간 간세포 내에서 HBVPol과 상기 단백질의 위치를 확인하여 이들이 존재하는 세포 소체와의 관련성을 이해함으로써 HBV에 의한 발암기작을 이해하고 치료의 근간이 될 수 있는 정보를 제공하는 것이다.

<15> 또한, 본 발명의 목적은 HepG2 세포에서 상기 복합체의 이동을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<16> 본 발명은 B형 간염에 관련된 B형 간염 바이러스 역전사효소 (HBVPol)와 결합하는 인간 간 세포 내의 단백질을 조사하여 11 kDa의 칼슘 결합 단백질인 p11이 HBVPol과 복합체를 형성함을 발견하였고, 이 HBVPol/p11 복합체는 세포의 핵 안에 존재하는 전골수성 백혈병 핵체 (PMLNB)로 이동하며 이 현상은 세포내 칼슘의 영향을 받아 p11이 수행함을 밝힌 것이다.

<17> 따라서, 본 발명은 B형 간염에 관련된 B형 간염 바이러스 폴리머라제 (HBVPol)에 비공유결합된 11 kDa의 칼슘 결합 단백질 p11의 복합체를 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 칼슘 이온 농도 조절제를 HepG2 세포에 투여하여 세포내 Ca 이온 농도에 따라 HBVPol/p11 복합체의 세포의 핵 내로의 이동을 조절하는 방법을 제공한다. 상기 상기 칼슘 이온 농도 조절제는 세포내 칼슘 이온의 농도를 증가시키는 것이거나 저하시키는 것일 수 있다.

- <19> 본 발명에서는 HBVp1과 결합할 수 있는 단백질을 찾고 인간 간세포 내에서 HBVp1과 상기 단백질의 위치를 확인하기 위해 효모 2 하이브리드 방법을 사용하였다.
- <20> 본 발명에 사용되는 효모 2 하이브리드 시스템에는 상이한 효모 균주, 예를 들어 에스. 세리비지애 (*S. cerevisiae*) 균주 AH109와 Y187을 사용할 수 있고, 모든 플라스미드의 분자생물학적 조작 실험은 이. 콜라이 (*E. coli*) 균주 DH5를 사용할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- <21> 효모 2 하이브리드 시스템은 인간 간세포의 유전정보로 형질전환된 효모 라이브러리 세포와 HBVp1 관련 유전자가 들어있는 세포를 효모 교배법으로 이배체를 만들어 각각의 HBVp1 관련 단백질과 결합하는 세포내 인자를 검색한다. 본 발명자들은 상기 효모 2 하이브리드 시스템을 이용하여 HBVp1과 결합하는 11 kDa의 인간 칼슘 결합 단백질인 p11이 HBVp1과 복합체를 형성함을 밝혀내었다.
- <22> 이와 같이 HBVp1에 결합하는 것으로 확인된 p11은 인간 간세포에 적용하기 위해 포유동물 발현 플라스미드에 클로닝되어 인간 간세포 균주의 형질전환에 사용한다. 형질전환된 인간 간세포를 p11에 대한 항체를 사용하여 반응시킨 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 세포를 관찰하여 HBVp1과 p11의 인간 간세포 내에서의 위치를 확인할 수 있다.
- <23> 이를 기초로 하여, 상기 세포를 PML 항체로 염색한 후 관찰하여 HBVp1만이 전달된 세포에서는 PMLNB와 HBVp1이 같은 곳에 존재하지 않고, p11을 HBVp1과 같이 전달한 세포에서만 HBVp1이 PMLNB로 이동함을 확인함으로써 HBVp1이 인간 간세포의 PMLNB로 이동할 때 p11이 매우 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.

<24> 또한, 본 발명에서는 HBVPol와 p11이 동시에 전달된 세포에 칼슘 차단제 (blocker)를 처리할 경우 HBVPol와 p11이 핵안으로 이동하고, 칼슘 이온 농도 증가제를 세포에 처리할 경우에는 HBVPol와 p11이 세포질에 머무는 것을 확인하였다. 따라서, 세포내 칼슘 이온 농도를 조절함으로써 세포내 HBVPol와 p11 복합체가 핵내의 PMLNB로 이동하는 것을 조절할 수 있다.

<25> 이하, 본 발명은 다음의 실시예에 의해 좀 더 구체적으로 설명하지만, 이것이 본 발명의 범주를 어떠한 방식으로든 한정하는 것은 아니다.

<26> <실시예>

<27> <본 발명의 효모 2 하이브리드 시스템에 사용된 효모와 박테리아>

<28> 효모 2 하이브리드 시스템에서는 에스. 세리비지애 (*S. cerevisiae*) 균주 AH109 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4*, *gal80*, *LYS2::GAL1UAS* -*GAL1TATA* -*HIS3*, *GAL2UAS* -*GAL2TATA* -*ADE2URA3::MEL1UAS* -*MEL1TATA* -*lacZ*, *MEL1*) (Clontech)와 Y187(*MAT*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4*, *gal80*, *met-*, *URA3::GAL1UAS* -*GAL1TATA* *lacZ*, *MEL1*) (Clontech)을 사용하였고 모든 플라스미드의 분자생물학적 조작 실험은 이. 콜라이 (*E. coli*) 균주 DH5를 사용하였다.

<29> <인간세포 균주와 항체>

<30> 실시예에서 사용한 인간 간세포 균주는 HepG2 (ATCC number: HC-8065)이다.

웨스턴(western) 실험, 면역침전 실험, 면역형광 실험에 사용한 항체는 항-Myc 마우스와 토끼 (Roche) 항체, 항-Flag, HA 마우스와 토끼 항체 (Santa Cruz Biotechnology) 그리고 항-PML 마우스 항체(Santa Cruz Biotechnology)이다. 항-토끼 염소 항체와 항-마우스

염소 2차 항체는 로다민 또는 FITC (플루오레세인 이소티오시아네이트) (Santa Cruz Biotechnology)가 부착되어 있는 것을 사용하였다.

<31> <실시에 1> 효모 2 하이브리드 GAL4 시스템

<32> MATCHMAKER 2 하이브리드 시스템(Clontech)을 사용하여 인간 간세포의 유전정보로 형질전환된 효모(Y187) 라이브러리(Clontech)를 사용하여 HBVPo1와 결합하는 세포내 인자를 검색하였다.

<33> 5'쪽은 NdeI로, 3'쪽은 SalI의 제한효소로 처리되도록 디자인한 Ayw 서브타입 HBVPo1와 8개의 도메인 변이체(도 1a)를 상기 제한효소 10단위를 사용하여 2시간씩 반응시킨 후, 95 °C에서 5분, 95 °C에서 30초, 54 °C에서 1분, 72 °C에서 3분 반응을 30회 반복 후 72 °C에서 7분 반응시키는 PCR법에 의해 증폭하고, T4 DNA 라이게아제를 반응당 4단위를 사용하여 상기와 동일한 제한효소로 처리한 pGBKT7 (Clontech)와 16 °C에서 20시간 동안 반응시켜 상기 플라스미드에 클로닝하였다.

<34> 형질전환시킨 AH109 효모를 YPAD 플레이트 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 2% 덱스트로스 (D-글루코스), 0.003% 아데닌, 2% 아가)에 도포하여 30 °C에서 24시간동안 생장시킨 후 루프(loop)로 50 μ l의 효모를 1.5 ml 튜브에 넣고 1 ml의 멸균 된 증류수로 세척하였다. 250 μ l의 플레이팅 솔루션 (40 % PEG3350, 0.01 M TE 완충액 (pH 7.5), 0.1 M 아세트산리튬 (pH 7.5))에 효모 펠렛을 녹인 후 이곳에 5 μ l의 단일가닥 DNA (10 mg/ml), 10 μ l의 1 M DTT 및 상기 제조한 1 μ g의 플라스미드 pGBKT7를 첨가한 후 6 시간 동안 상온에 방치하였다. 이 세포를 42 °C에서 15분간 열충격을 준 후 3000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 효모 펠렛은 1 ml의 멸균 증류수로 세척한 후 100 μ l의 TE 완

중액 (pH 7.5)를 효모 펠렛에 첨가하여 SD-Trp 플레이트에 도포하여 30 °C에서 세포를
생장시켰다.

<35> 상기 인간 간세포의 유전자 라이브러리를 함유하는 효모 라이브러리 세포를 Leu이
존재하지 않는 액체 배지 (아미노산이 존재하지 않는 0.67% 효모 질소 염기, 20 mg/1 L-
아르기닌 HCl, 30 mg/1 L-이소류신, 30 mg/1 라이신 HCl, 20 mg/1 L-메티오닌, 50 mg/1
L-페닐알라닌, 200 mg/1 L-트레오닌, 30 mg/1 L-티로신, 20 mg/1 L-우라실, 150 mg/1 L-
발린, 20 mg/1 아데닌, 20 mg/1 히스티딘, 20 mg/1 트립토판 및 2% 글루코스 함유)에서
24시간 생장시켜 OD₆₀₀ 값이 0.8에 이르게 하였다.

<36> 이와 동시에, HBVPol 관련 유전자가 들어 있는 각각의 효모를 Trp가 존재하지 않는
액체 배지 (아미노산이 존재하지 않는 0.67% 효모 질소 염기, 20 mg/1 L-아르기닌 HCl,
30 mg/1 L-이소류신, 30 mg/1 라이신 HCl, 20 mg/1 L-메티오닌, 50 mg/1 L-페닐알라닌,
200 mg/1 L-트레오닌, 30 mg/1 L-티로신, 20 mg/1 L-우라실, 150 mg/1 L-발린, 20 mg/1
아데닌, 20 mg/1 히스티딘, 100 mg/1 루이신 및 2% 글루코스 함유)에서 30시간 생장시켜
OD₆₀₀ 값이 0.9에 이르게 하였다. 이후, 라이브러리 세포 2 ml과 각각의 HBVPol 세포
50 ml을 45 ml의 YPDA 효모 복합 배지에 혼합하여 30 °C에서 20시간 동안 교반하며 교배
시켰다.

<37> 생성된 이배체 효모를 수거하여 leu, trp, ade 및 his이 존재하지 않는 배지 플레
이트 (아미노산이 존재하지 않는 0.67% 효모 질소 염기, 20 mg/1 L-아르기닌 HCl, 30
mg/1 L-이소류신, 30 mg/1 라이신 HCl, 20 mg/1 L-메티오닌, 50 mg/1 L-페닐알라닌, 200
mg/1 L-트레오닌, 30 mg/1 L-티로신, 20 mg/1 L-우라실, 150 mg/1 L-발린, 및 2% 글루코

스 함유)에 도포하여 HBVPol와 라이브러리 단백질 간에 상호결합이 있는 이배체를 선택하였다.

- <38> 균주 AH109 (*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2::GAL1UAS -GAL1TATA -HIS3, GAL2UAS -GAL2TATA -ADE 2URA3::MEL1UAS -MEL1TATA -lacZ, MEL1*) 및 Y187(*MAT, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, gal80, met-, URA3::GAL1UAS -GAL1TATA lacZ, MEL1*)의 유전자형에 의해 상기 효모 세포에 삽입된 유전자간의 상호 결합이 있게 되면 Ade, His, Trp 및 Leu를 포함하지 않는 고체 배지에서 성장하는 효모 이배체는 AH109의 HBVPol와 Y187의 라이브러리 단백질 간에 상호결합이 있음을 의미한다 (Bendixen, C., Gangloff, S., Rothstein, R. (1994) A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, 22, 1778-1779 참조).

- <39> <실시예 2> 공면역침전 (Co-immunoprecipitation) 분석

- <40> 효모 2 하이브리드 시스템을 이용하여 HBVPol와 결합하는 11 kDa의 인간 칼슘 결합 단백질인 p11을 찾았으며, Promega사의 TNT 커플드 망상적혈구 용해물 (TNT coupled reticulocyte lysate System)을 이용하여 이 결합을 확인하였다.

- <41> p11 코딩 ORF는 Y187 효모 세포 내의 pGADT7(Clontech)에 클로닝되어 있기 때문에 T7 프로모터를 이용하여 L-[35S]-메티오닌을 결합시켜 p11을 합성할 수 있다. 이를 1g의 항 HA 마우스 항체로 항체로 2 시간 가량 4 °C에서 반응시켰다. 이들을 단백질 G 플러스/단백질 A 아가로스 (Oncogene, Inc.) 비드를 사용하여 침전시키고, 반응물을 15% SDS-PAGE로 분석하였다 (도 2, 레인 1). 실시예 1에서 설명한 바와 같이, pGBKT7에 클

로닝되어 있는 HBV Pol 역시 같은 방법으로 합성한 후 p11의 경우와 같은 방법으로 수행하였다 (도 2, 레인 2).

<42> 두 단백질을 상온에서 1시간 가량 방치한 후 1 g의 항-Myc (HBV Pol 쪽) 또는 HA (p11 쪽) 마우스 항체로 2 시간 가량 4 °C에서 반응시켰다. 이들을 단백질 G 플러스/단백질 A 아가로스 (Oncogene, Inc.) 비드를 사용하여 침전시킨 후 세척하여 항체가 결합한 HBV Pol 또는 p11에 결합하지 않은 물질을 제거하고, 반응물을 SDS 로딩 완충액으로 95 °C에서 5분간 반응하여 단백질 G 플러스/단백질 A 아가로스로부터 분리하여 15% SDS-PAGE로 분석하여 방사능 결과물을 X선 필름으로 분석하였다 (도 2의 레인 3 및 4).

<43> 상기 도 2의 레인 3은 HBV Pol에 대한 항-Myc 마우스 항체를 사용하여 실험한 결과이고, 레인 4는 p11에 대한 HA 마우스 항체를 사용하여 실험한 결과로서 HBV Pol과 p11의 밴드가 각각 분리된 상태로 존재함을 보여주고, 이것은 HBV Pol과 p11이 비공유결합에 의해 복합체를 형성한다는 것을 의미한다.

<44> <실시예 3> 포유동물 발현 플라스미드 제조

<45> 확인한 p11을 인간 간세포에 적용하기 위해 포유동물 발현 플라스미드에 재클로닝하였다.

<46> HBV Pol은 95 °C에서 5분 반응 후, 95 °C 30초, 54 °C 1분, 72 °C 3분 반응을 30회 반복한 후 72 °C에서 7분 반응시키는 PCR 반응에 의해 증폭하고, 10 단위의 HindIII 및 SalI으로 2시간 처리한 후, 반응당 4 단위의 라이게아제를 사용하여 동일한 제한효소

로 처리된 pCMV2A 벡터(Stratagene)와 16 °C에서 20시간 동안 반응시켜 HBVPol 코딩 서열을 포함하는 pCMV-tag2A 플라스미드를 제조하였다 (도 7).

- <47> p11 PCR 반응은 95 °C에서 5분 반응 후, 95 °C 30초, 55 °C 1분, 72 °C 1분 반응을 30회 반복한 후 72 °C에서 7분 반응시키는 PCR 반응에 의해 증폭하고, 10 단위의 EcoRI 및 XhoI으로 2시간 처리한 후, 반응당 4 단위의 라이게이즈를 사용하여 동일한 제한효소로 처리된 pCMV3B 벡터(Stratagene)와 16 °C에서 20시간 동안 반응시켜 p11 코딩 서열을 포함하는 pCMV-tag3B 플라스미드를 제조하였다 (도 8 참조).

<48> <실시예 4> 면역형광 실험 및 현미경 실험

- <49> HepG2는 DMEM(0.1 mM 비필수 아미노산 및 10% FBS로 보충됨, 배양조건; 37 °C, 95:5% (v/v)의 공기와 CO₂의 혼합물로 가습)이 충전된 챔버 슬라이드에서 생장시켰으며, 세포 내로의 유전자 전달은 에펙텐(effectene) (Qiagen)을 사용하였다. 약물, 특히 EGTA 등을 처리한 세포나 유전자를 전달시킨 세포는 모든 처리 후에 PBS로 닦아내고 100% 메탄올로 -20 °C에서 15분 동안 고정시켰다. 이 슬라이드는 차단 용액 (1% 염소 혈청 /PBS)으로 상온에서 30분 동안 처리한 후, p11에 대한 항-Myc 토끼 (1:200) 항체, HBVPol에 대한 항-Flag 토끼(1:200) 항체, 또는 항-PML 마우스 (1:200) 항체를 사용하여 4 °C에서 하루 동안 반응시켰다.

- <50> 반응 후 세포는 로다민 또는 플루오레세인 이소티오시아네이트가 부착되어 있는 항-토끼 또는 항-마우스 염소 2차 항체와 37 °C에서 반응시킨 후 마운팅(mounting) 용액으로 커버슬립(coverslip)을 부착한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM Bio-Rad 1024)로 염색된 세포를 관찰하였다. 도 3은 왼쪽부터 차례로 HBVPol, p11 및 이 두 단백질의

중첩 사진으로서, 이들이 인간 간세포인 HepG2 세포에서 세포질, 핵막 및 핵 안에서 점을 이루며 같이 위치함을 확인할 수 있다.

<51> HBVp1과 p11이 세포의 핵내 점을 이루는 부분에 착안하여 이를 PML 항체로 염색한 결과 도 4의 A와 같이 PMLNB와 p11 및 HBVp1가 동시에 같은 위치에 존재함을 확인하였다. 또한, HBVp1만이 전달된 세포에서는 PMLNB와 HBVp1가 같은 곳에 존재하지 않고(도 4의 B), p11을 HBVp1와 같이 전달한 세포에서만 HBVp1가 PMLNB로 이동함을 확인할 수 있었다(도 4의 C). 이를 통해, HBVp1가 인간 간세포의 PMLNB로 이동할 때 p11이 매우 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.

<52> p11이 칼슘 결합 단백질임에 착안하여 HBVp1와 p11이 동시에 전달된 세포에 0.5 mM 농도의 칼슘 이온 농도 저해제인 EGTA를 48시간 처리하였을 때 다수의 HBVp1와 p11이 핵안으로 이동함을 확인하였고(도 5, EGTA행), 반대로 30 μ M 농도의 칼슘 이온 농도 증가제인 발리노마이신을 세포에 24 시간 동안 처리하였을 경우에는 HBVp1와 p11은 세포질에 머무는 것을 확인하였다(도 5, val행).

<53> 이와 같이, 본 실시예를 통해 HBVp1와 p11이 서로 결합하여 핵안의 PMLNB로 이동하고, 이때 p11이 HBVp1의 이동에 매우 중요하며, 또한 세포 내의 낮은 칼슘 이온 농도 이들의 핵안으로의 이동에 매우 중요함을 확인할 수 있었다. 따라서, 세포 내 칼슘의 농도를 조절함으로써 칼슘 결합 단백질인 p11과 HBVp1의 세포 내 위치를 조절할 수 있음이 입증되었다.

<54> 또한, pCMV-tag3B 플라스미드를 사용하여 2,2,1.5 HepG2를 형질전환시켜 p11만을 발현시키고, p11에 대한 항-Myc 토끼 (1:200) 항체를 이용하여 반응시킨 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM Bio-Rad 1024)로 관찰하였다. 이와 같이 HBV가 발생하는

2,2,1.5 HepG2 세포에 P11이 존재할 경우 PMLNB의 크기 또는 수가 정상세포의 PMLNB보다 증가한 것이 확인되었다 (도 6 참조).

<55> HBV 감염의 의한 간세포암종 (HCC) 환자에서 PML NB가 암의 진행 단계가 진행될수록 그 개수와 크기가 증가한다는 보고(Yoon, G.S., 2001, J.korean Med.Sci., 16, 433-438)가 있었으나, 이 보고에서는 단지 암이 진행됨에 따라 PML NB의 개수 또는 크기가 증가한다는 결과만을 제시하고 있으나, 본 발명에 의해 상기 PMLNB의 크기 또는 수의 증가가 p11에 의한 것임이 입증된 것이다.

【발명의 효과】

<56> 본 발명은 HBVp1와 세포내 결합인자인 p11을 확인하고 이 인자가 칼슘의 영향을 받아 HBVp1를 간세포의 PMLNB로 유도함을 확인함으로써 간암치료의 여러 가지 목표물을 제공할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

전골수성 백혈병 핵체 (PMLNB)로 이동하는 B형 간염 바이러스 역전사효소(HBVPol)에 비공유결합된 11 kDa의 칼슘 결합 단백질 p11의 복합체.

【청구항 2】

칼슘 이온 농도 조절제를 HepG2 세포에 투여하여 세포내 Ca 이온 농도에 따라 HBVPol/p11 복합체의 세포의 핵 내로의 이동을 조절하는 방법.

【청구항 3】

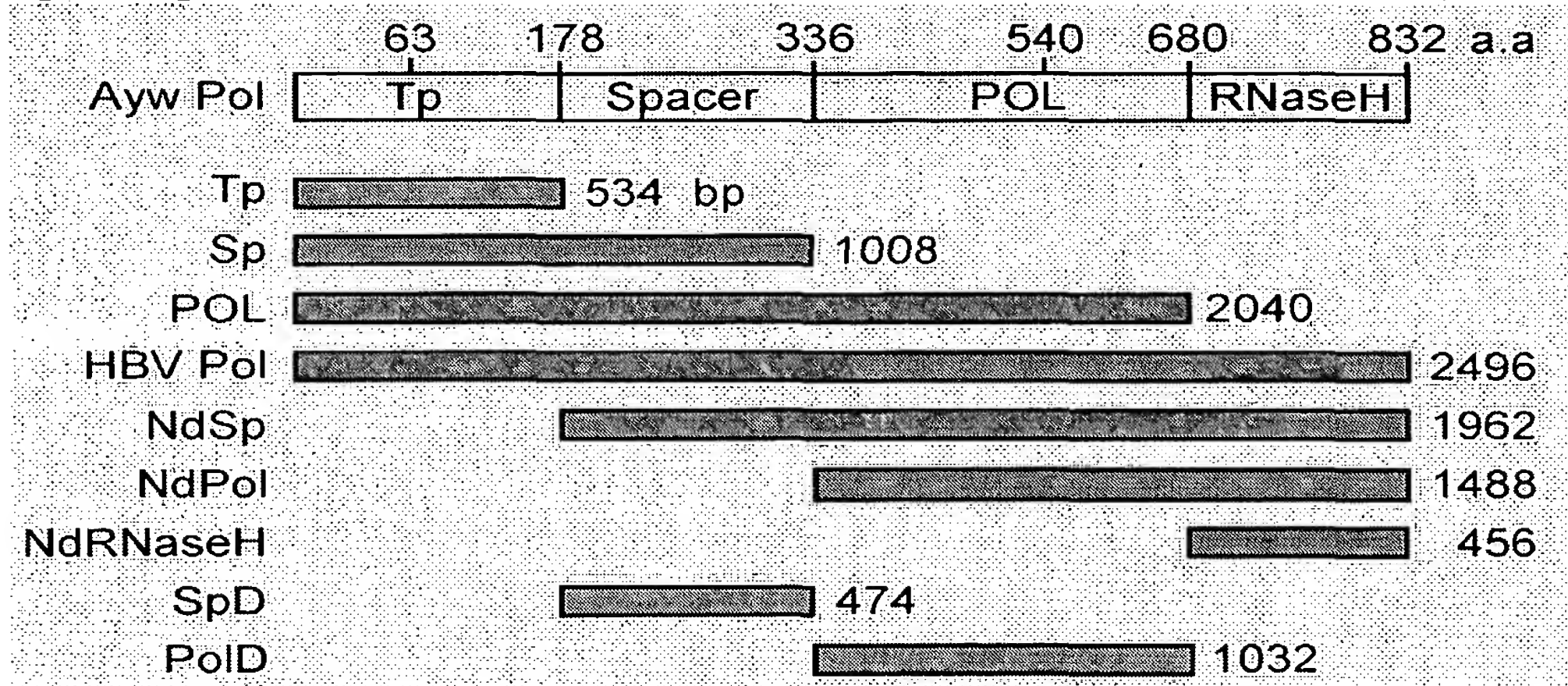
제2항에 있어서, 상기 칼슘 이온 농도 조절제가 세포내 칼슘 이온의 농도를 증가시키는 것인 방법.

【청구항 4】

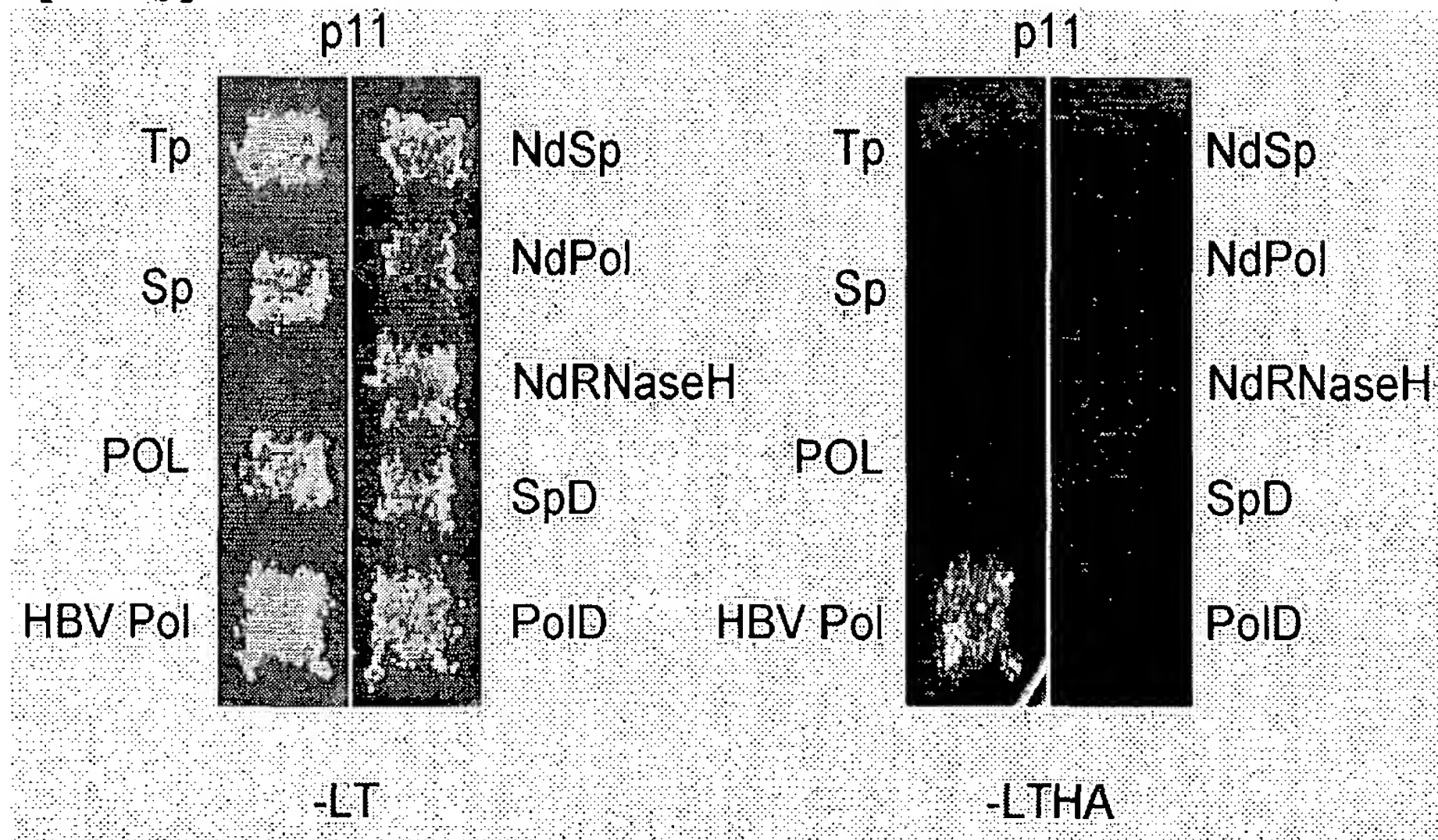
제2항에 있어서, 상기 칼슘 이온 농도 조절제가 세포내 칼슘 이온의 농도를 저하시키는 것인 방법.

【도면】

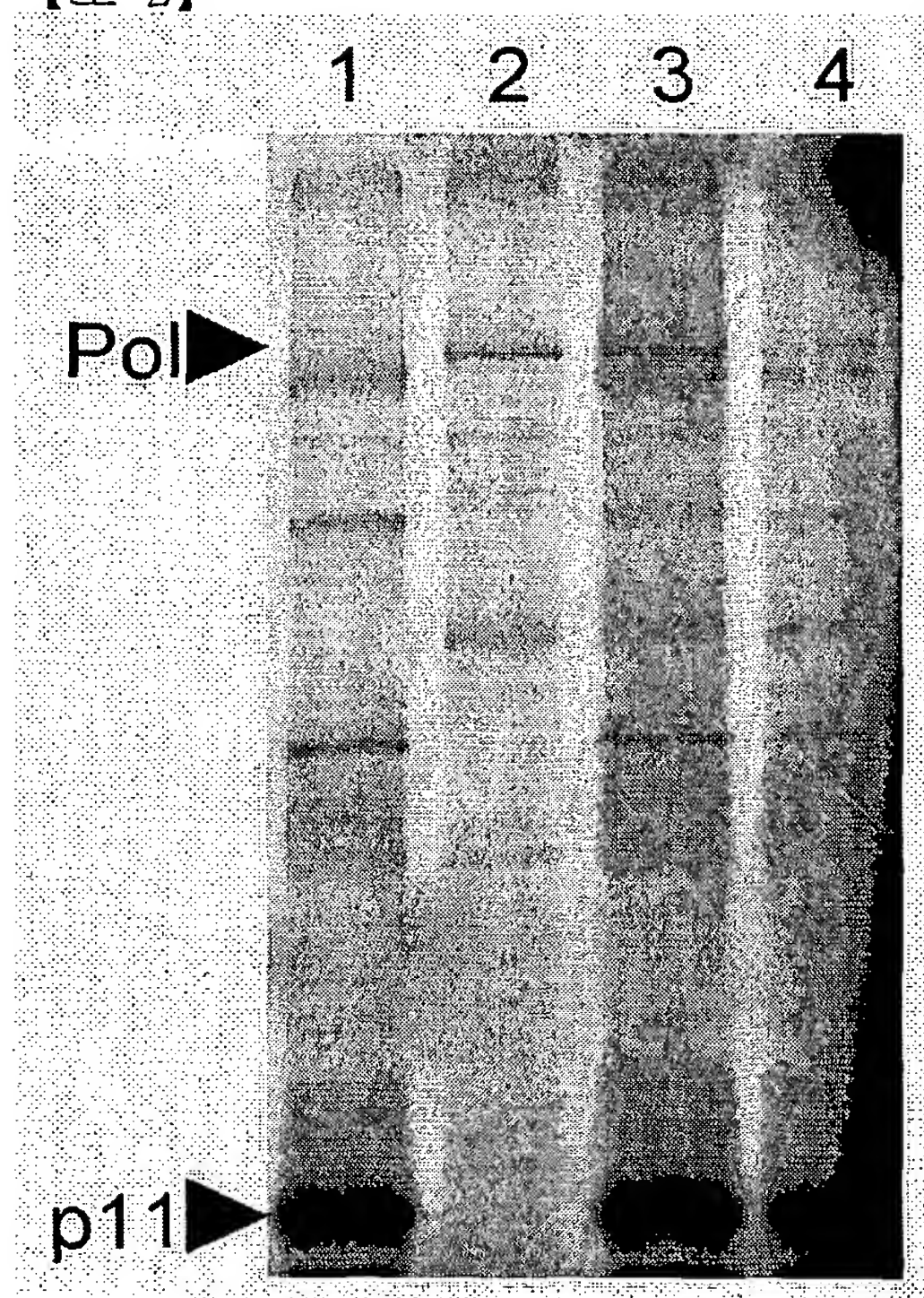
【도 1a】



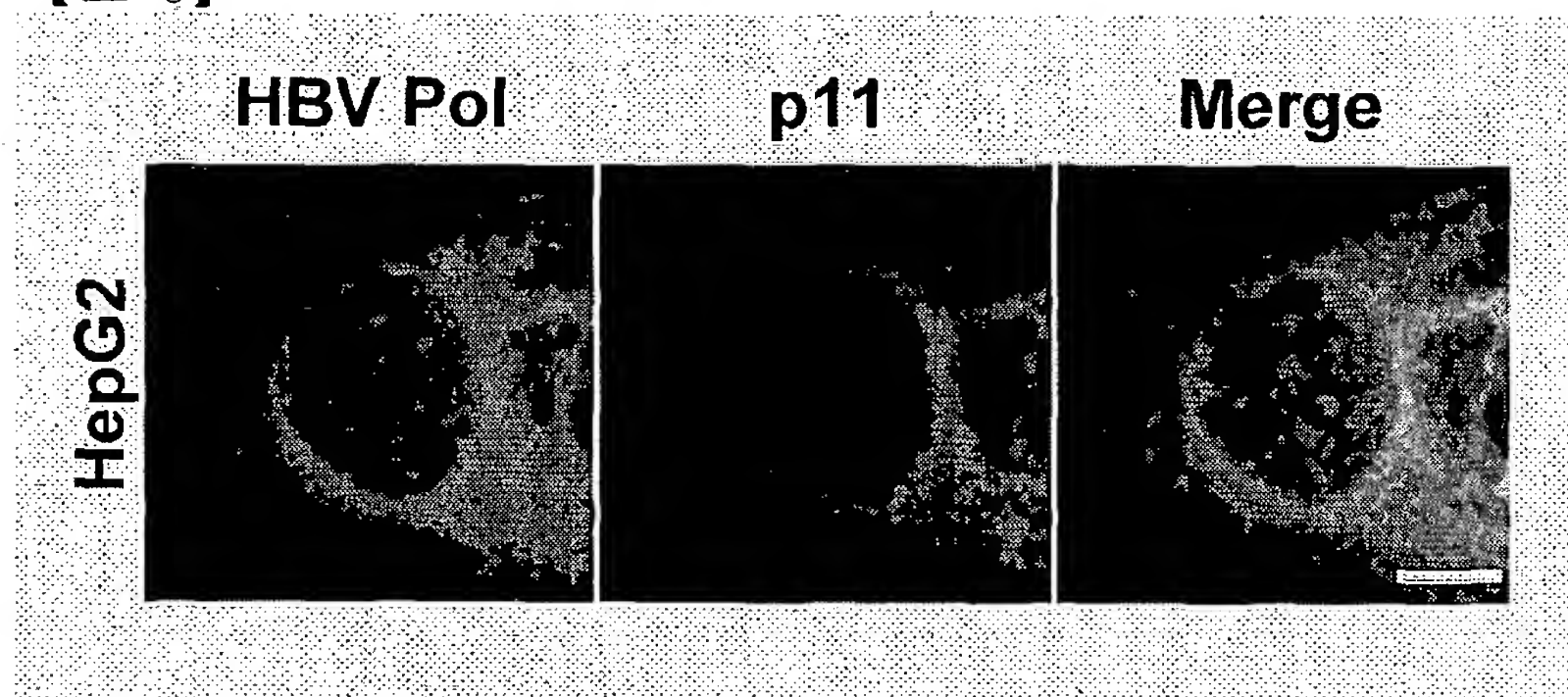
【도 1b】



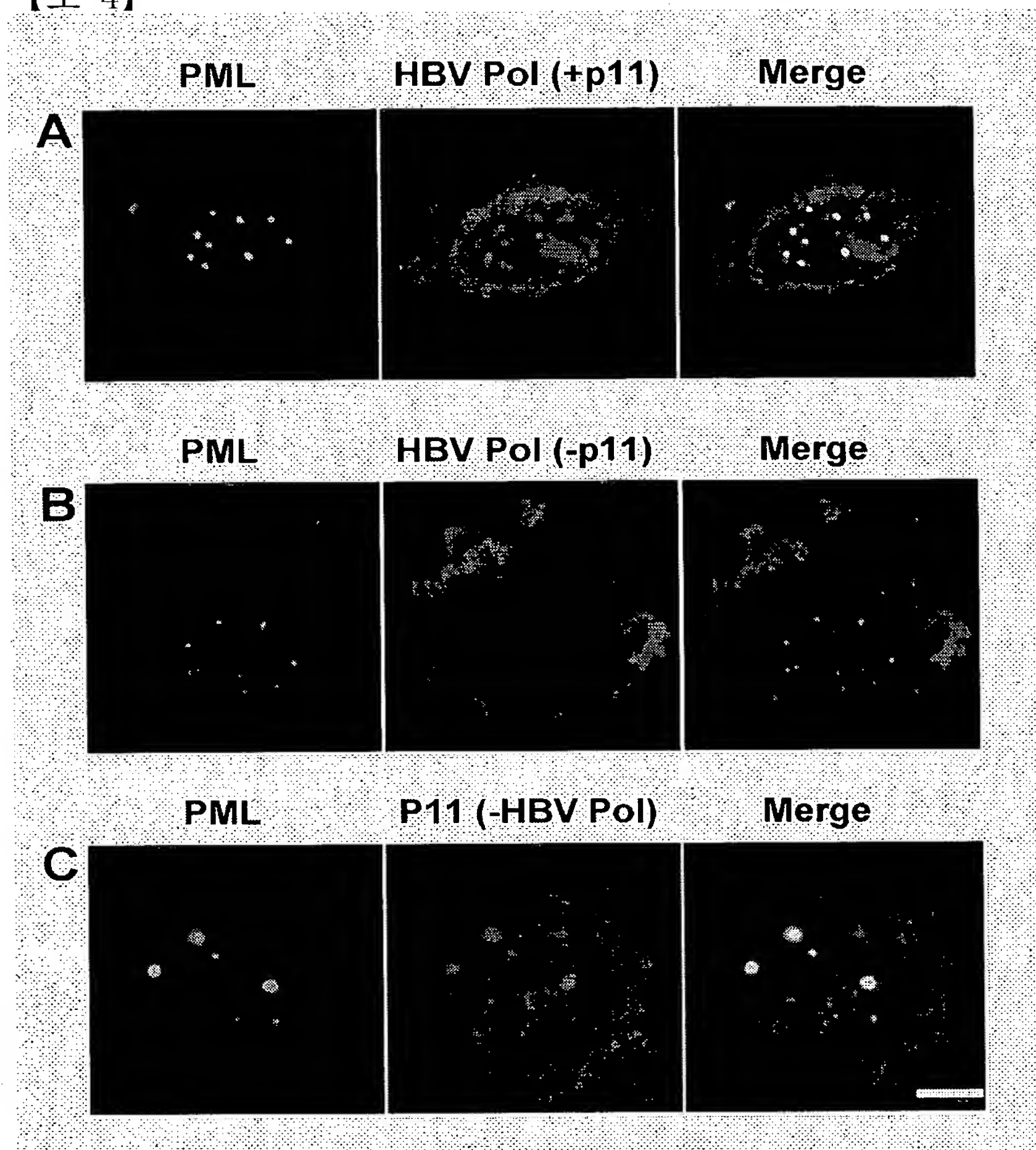
【도 2】



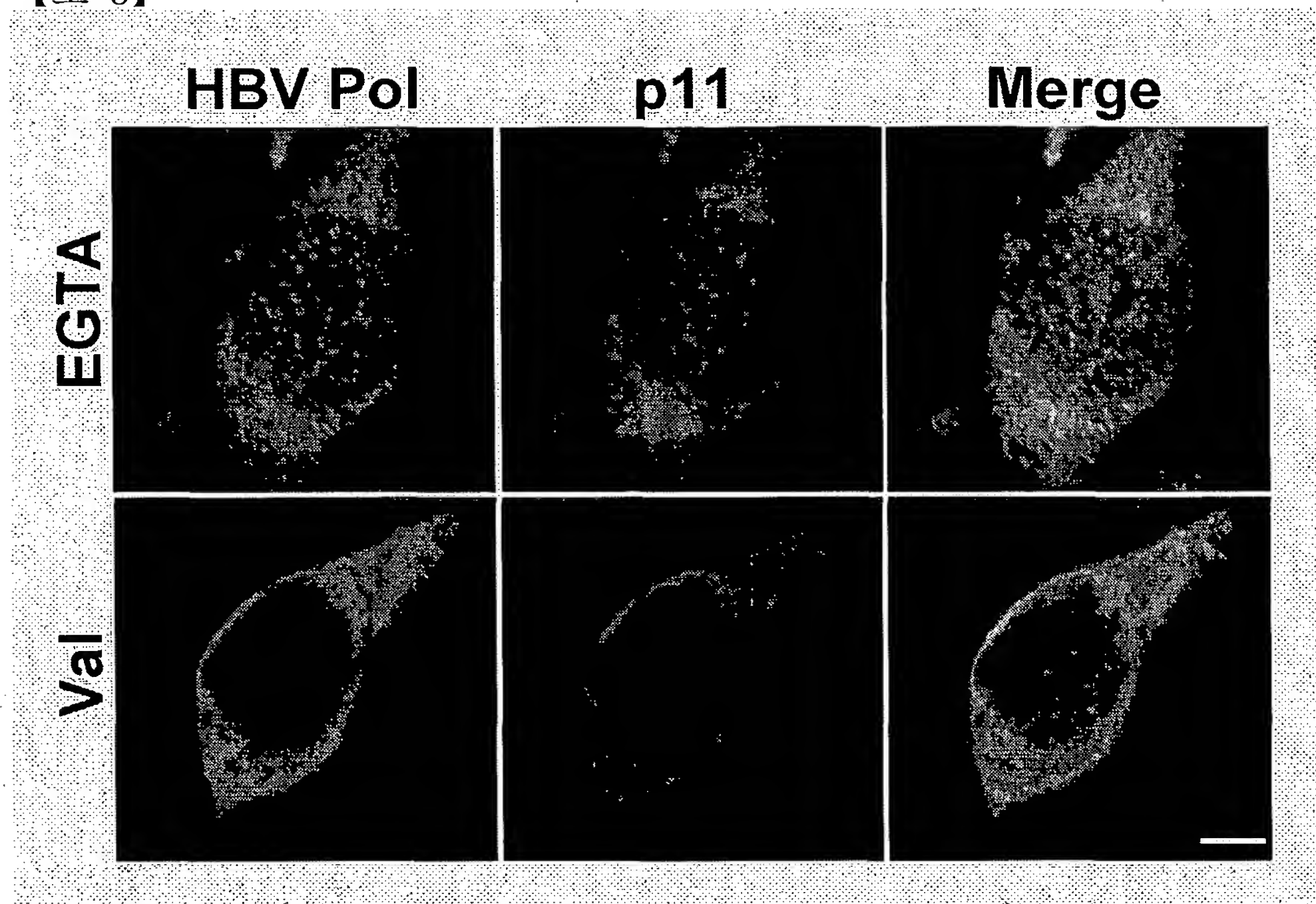
【도 3】



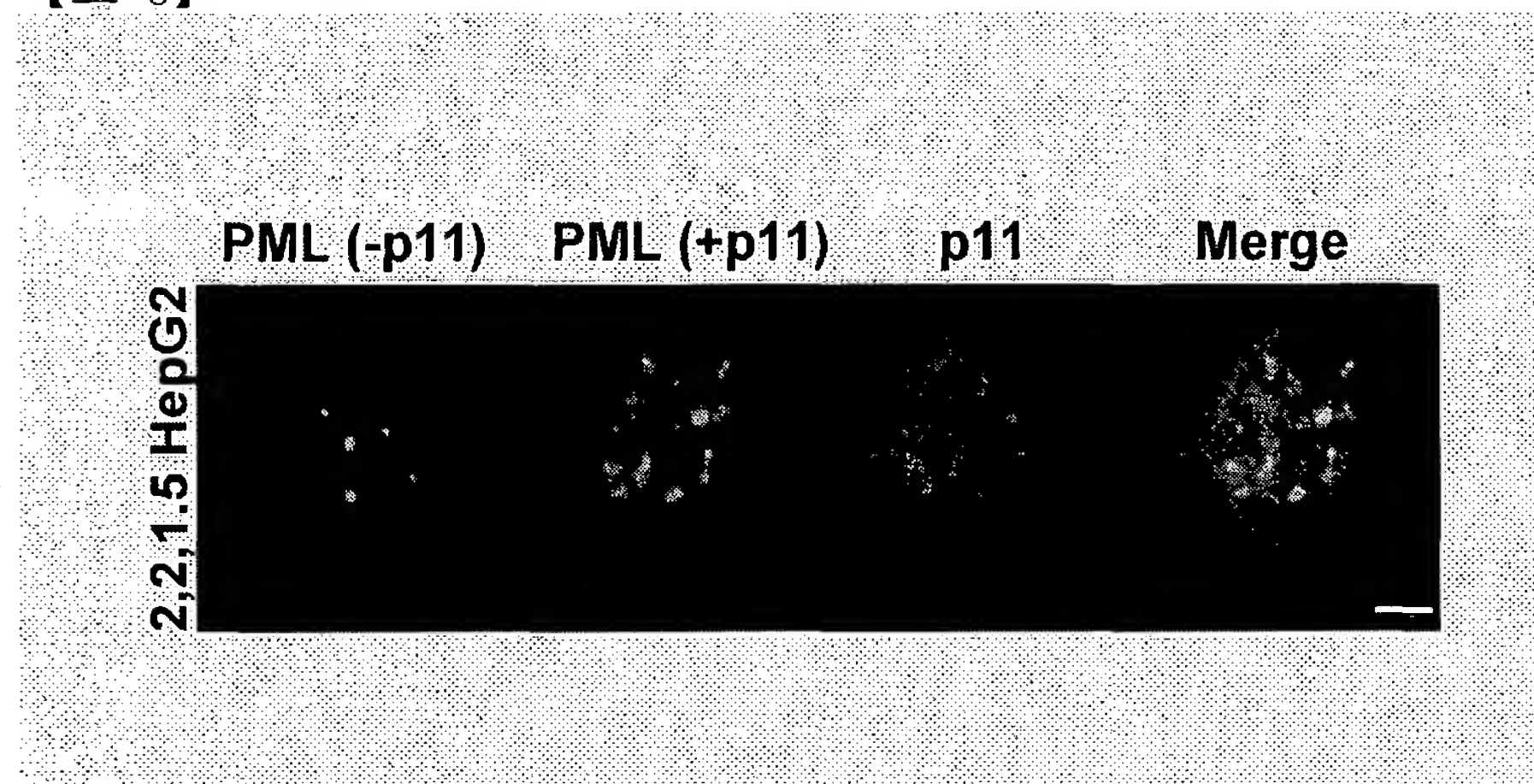
【도 4】



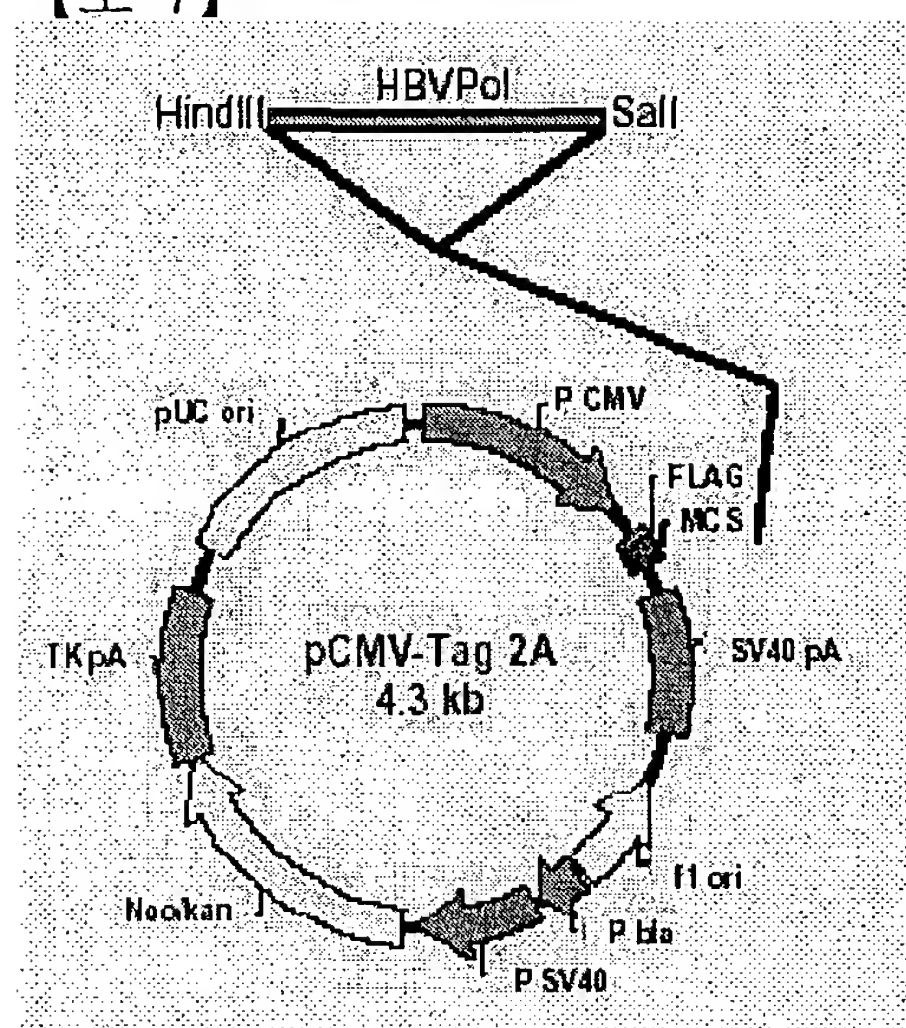
【도 5】



【도 6】



【도 7】



【도 8】

